

EINFLUSS
VON VERSCHIEDENEN PURINEN
AUF DEN PYRIMIDINSTOFFWECHSEL
VON MENSCHLICHEN
LYMPHOZYTENKULTUREN

Adelheid Laurien

Diss
München
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0107

Aus der Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. N. Zöllner

EINFLUSS VON VERSCHIEDENEN PURINEN AUF DEN PYRIMIDIN-
STOFFWECHSEL VON MENSCHLICHEN LYMPHOZYTENKULTUREN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Adelheid Laurien

aus
München

Jahr
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gröbner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.1986

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. ALLGEMEINES	2
2.1. Pyrimidinstoffwechsel	3
2.1.1. Regulation der Pyrimidinsynthese	5
2.2. Störungen des Pyrimidinstoffwechsels	6
2.2.1. Hereditäre Orotazidurie	6
2.2.2. Die Beziehungen zwischen Karbamyolphosphat, Pyrimidinsynthese und Harnstoffzyklus	8
2.2.3. Orotazidurie infolge Fehlens der Ornithin- Transcarbamylase-Aktivität	9
2.2.4. Ernährungsbedingte Orotazidurie	10
2.2.5. Arzneimittelbedingte Orotazidurien	10
2.2.5.1. 6-Azauridin	10
2.2.5.2. Allopurinol (Oxipurinol)	11
2.2.5.3. Barbitursäure	13
3. METHODEN	
3.1. Material	13
3.2. Präparation der Lymphozytenkulturen	16
3.3. Arbeitsgang	
3.3.1. Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure	16
3.3.2. Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C , bzw. Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren	19
4. ERGEBNISSE	20
5. DISKUSSION	45
6. ZUSAMMENFASSUNG	49
7. LITERATURVERZEICHNIS	51
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61
9. LEBENSLAUF	62

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.

Pyrimidinnukleotide können entweder aus Kohlendioxyd, Adenosintriphosphat (ATP) und Glutamin oder über eine Reutilisation von Pyrimidinnukleosiden aufgebaut werden. Eine Störung der de novo Synthese führt zu dem sehr seltenen Krankheitsbild der hereditären Orotazidurie, die mit einer renalen Orotsäureausscheidung von bis zu 1,5 g/die sowie mit einer megaloblastären Anämie, Leukopenie und einer Wachstums- und Entwicklungsverzögerung einhergeht.

1970 fanden sowohl FOX und Mitarbeiter als auch KELLEY und BEARDMORE, daß das Gichttherapeutikum Allopurinol nicht nur in den Purin-, sondern auch in den Pyrimidinstoffwechsel eingreift und gewissermaßen eine inkomplette Phänokopie der hereditären Orotazidurie verursacht. Die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie ist mit 15 - 100 mg/die deutlich niedriger als bei der hereditären Orotazidurie. Entsprechende klinische Erscheinungen werden unter Allopurinol nicht beobachtet.

ZÖLLNER und GRÖBNER fanden erstmals 1971 an Versuchspersonen, die eine purinar- und pyrimidinarme Diät erhalten hatten, daß sich die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie durch Ribonucleinsäure (RNS) oder RNS-Hydrolysat reduzieren läßt.

Dies war ein erster Hinweis, daß RNS aus der Nahrung die Pyrimidinsynthese zu beeinflussen vermag. In weiteren Ernährungsversuchen wurde der Einfluß der Bausteine der RNS, der Purin- und Pyrimidinnukleoside, -nukleotide sowie der -basen untersucht (GRÖBNER und ZÖLLNER, 1977; ZÖLLNER und GRÖBNER, 1977; ZÖLLNER, GRÖBNER, RAUCH-JANSEN, 1977; GRÖBNER und ZÖLLNER, 1983).

Es zeigte sich, daß auch Hypoxanthin, Nukleoside und Nukleotide in unterschiedlichem Maße die Orotazidurie vermindern konnten.

Während der Wirkungsmechanismus für das Pyrimidin-nukleosid Uridin bekannt ist und bereits therapeutisch genutzt wird, ist der Mechanismus für Purine noch weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Mechanismus dieser Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Purine näher zu betrachten. Es wurde außerdem Natrium-phenylaethylbarbituricum (NaPAB) untersucht, da frühere Untersuchungen in unserem Labor ergeben hatten, daß die Verabreichung von Barbitursäure ebenfalls zu einer Orotazidurie führt (GRÖBNER et.al., unveröffentlicht).

Es wurde mit Hilfe von menschlichen Lymphozyten-kulturen ein Modell aufgebaut, mit dem es möglich ist, die Ernährungsversuche gewissermaßen in vitro nachzu-vollziehen.

Durch Messung des Einbaus von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure war es möglich, den ersten Teil der Pyrimidin-synthese zu beurteilen. Der zweite Teil, der die Enzyme Orotatphosphoribosyl-Transferase/Orotidin-5-Phosphat-dekarboxylase (OPRT/ODC) betrifft, konnte durch den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren erfaßt werden.

Der Salvage pathway wurde durch Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren erfaßt.

2. ALLGEMEINES

2.1. Pyrimidinstoffwechsel.

Pyrimidinnukleotide können beim Menschen entweder de novo synthetisiert oder aus Pyrimidinnukleosiden aufgebaut werden.

Der erste Schritt der Pyrimidinsynthese führt beim Menschen zur Bildung von Karbamyolphosphat. Diese Reaktion wird durch das Enzym Karbamyolphosphat-Synthetase (CPS) katalysiert und benötigt als Substrat Adenosin-5-triphosphat, Kohlendioxyd sowie Ammonium oder Glutamin.

Bei Säugern gibt es zwei verschiedene Karbamyolphosphat-Synthetasen. Das eine Enzym, die Karbamyolphosphat-Synthetase I (CPS I), das in den Mitochondrien der Leber, Niere und des Darms vorkommt, verwertet Ammonium und ist vor allem an der Produktion von Harnstoff beteiligt, das andere Enzym (CPS II) verwertet Glutamin und liefert Karbamyolphosphat primär für die Pyrimidinbiosynthese.

Aus Karbamyolphosphat entsteht unter Mitwirkung der Aspartat-Transkarbamylase (ATC) Karbamylaspartat. Der Pyrimidinring wird dann durch die reversible Dehydrierung von Karbamylaspartat zu Dihydroorotsäure gebildet. Auf den Ringschluß folgt die Oxidation zu Orotsäure. Diese beiden Schritte werden von den Enzymen Dihydroorotase (DHO) und Dihydroorotsäure-Dehydrogenase (DHOD) katalysiert. Aus Orotsäure, dem eigentlichen Endprodukt der Pyrimidinsynthese, entsteht durch Reaktion mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) das erste Pyrimidinnukleotid, Orotidin-5-monophosphat. Diese Reaktion wird katalysiert durch das Ferment Orotatphosphoribosyl-Transferase (OPRT). Orotidin-5-monophosphat wird schließlich durch die Orotidyl-Dekarboxylase zu Uridin-5-phosphat dekarboxyliert.

Die Pyrimidinribonukleosid-Monophosphate und Pyrimidindesoxyribonukleosid-Derivate können durch verschiedene Enzyme zu Di- und Triphosphaten phosphoryliert werden.

So wird Uridin-5-monophosphat zu Uridin-5-diphosphat und Uridin-5-triphosphat umgewandelt. Aus letzterer Verbindung kann Zytidin-5-triphosphat gebildet werden. Andererseits können Uridin- und Zytidin-5-monophosphat auch direkt aus Pyrimidinnukleosiden entstehen.

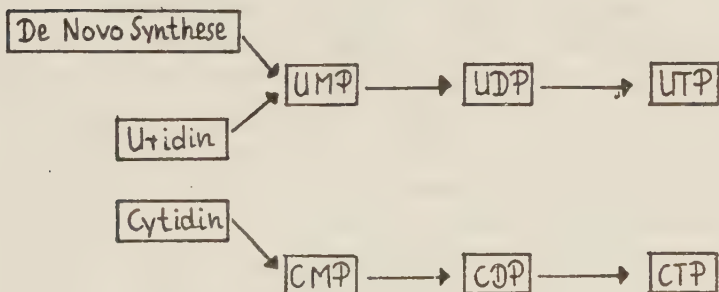


Abb.2 Umwandlung von Pyrimidinnukleotiden

UMP: Uridin-5-monophosphat	CTP: Zytidin-5-triphosphat
UDP: Uridin-5-diphosphat	CDP: Zytidin-5-diphosphat
UTP: Uridin-5-triphosphat	CMP: Zytidin-5-monophosphat

2.1.1. Regulation der Pyrimidinsynthese de novo.

Eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der Pyrimidinsynthese spielt die Karbamyolphosphat-Synthetase II, die durch 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat und Adenosin-5-Triphosphat aktiviert und durch Uridin-5-Triphosphat gehemmt wird (TATIBANA, SHIGESHADA, 1972).

Karbamyolphosphat hemmt die Glutaminsynthetase (TATE,

MEISTER, 1971) und kontrolliert auf diese Weise das Angebot an Glutamin.

Die Aspartat-Transkarbamylase wird durch die Endprodukte des Pyrimidinstoffwechsels nicht gehemmt (CURCI, CONACHIE, 1964; BRESNICK, MOSSE, 1966; PRAGER et al., 1967; HOOGENRAAD et al., 1971; KOSKIMIES et al., 1971).

Die Dihydroorotase wird im Sinne einer Feedback-Hemmung durch die Orotsäure reguliert (BRESNICK, HITCHINGS, 1961; HAGER, JONES, 1965).

Phosphoribosylphosphat (PRPP) dient als Substrat für die Orotatphosphoribosyl-Transferase und übt dadurch einen regulierenden Einfluß auf die Enzymaktivitäten aus (SHOAF, JONES, 1973).

Eine Zunahme der intrazellulären Konzentration von PRPP ist mit einer vermehrten Bildung von UDP, UTP und CTP verknüpft (NUKI et al., 1973).

Eine Verminderung der PRPP-Konzentration hat eine vermehrte renale Ausscheidung von Orotsäure zur Folge (WADA, NISHIMURA, 1974).

Eine weitere Kontrollmöglichkeit betrifft die Orotidyl-Dekarboxylase, die durch Uridin-5-monophosphat gehemmt wird.

2.2. Störungen des Pyrimidinstoffwechsels

2.2.1. Hereditäre Orotazidurie Typ I und Typ II

Die hereditäre Orotazidurie ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Pyrimidinstoffwechsels, die mit einer gegen Folsäure resistenten megaloblastären Anämie, Leukopenie, Wachstums- und Entwicklungsverzögerung sowie einer

exessiven renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin einhergeht (FOX, O'SULLIVAN, PIRKIN, 1969; SEEGLMILLER, 1969; FOX, WOOD, ROYSE-SMITH, O'SULLIVAN, 1973).

Ursache ist beim Typ I das Fehlen der Aktivitäten von Orotatphosphoribosyl-Transferase und Orotidyl-Dekarboxylase. Bei dem von FOX und Mitarbeitern (FOX, O'SULLIVAN, PIRKIN, 1969) beschriebenen Typ II der hereditären Orotazidurie wurde nur ein Fehlen der Orotidyl-Dekarboxylase Aktivität festgestellt, während die Aktivität der Orotatphosphoribosyl-Transferase erhöht war (FOX, O'SULLIVAN, 1969; FOX, WOOD, ROYSE-SMITH, O'SULLIVAN, 1973; GRÖBNER, ZÖLLNER, Münch.Med.Wschr. 117, Nr. 37, 1975).

Homozygote Erbträger der hereditären Orotazidurie sind auf eine Pyrimidin-Ersatztherapie angewiesen, um überleben zu können. Der Erfolg dieser Behandlung resultiert in einer Verbesserung des Blutbefundes, einer auffallend guten Beeinflussung des Wachstums und der Entwicklung und in einer Abnahme der renalen Orotsäureausscheidung (KELLEY, SMITH JR., 1978).

Heterozygote Erbträger weisen eine verminderte Aktivität der Orotatphosphoribosyl-Transferase und der Orotidin-5-phosphatdecarboxylase auf und scheiden vermehrt Orotsäure im Urin aus, sind aber symptomlos.

Die vermehrte Orotsäureausscheidung beruht auf der Anhäufung von intrazellulärer Orotsäure. Zudem führt der Wegfall der Endprodukthemmung zu einer verstärkten de novo Synthese. Entsprechend führt die Verabreichung von Uridin zur Bildung von Uridin-5-triphosphat über der Salvage pathway und damit zu einer Abnahme der renalen Orotsäureausscheidung.

2.2.2. Die Beziehungen zwischen Karbamyolphosphat, Pyrimidinsynthese und Harnstoffzyklus.

Die intramitochondrielle Karbamyolphosphat-Synthetase I (CPS I) katalysiert die Bildung von Karbamyolphosphat, das zusammen mit Ornithin und unter der Mitwirkung der Ornithin-Transcarbamylase (OTC) Citrullin bildet. Aus mehreren Zwischenprodukten entsteht zuletzt der Harnstoff, der in der Leber als wichtigstes Endprodukt des Eiweißstoffwechsels gebildet und im Harn ausgeschieden wird.

Das durch die extramitochondrielle Karbamyolphosphatase II synthetisierte Karbamyolphosphat bildet mit der Asparaginsäure und der Aspartat-Transcarbamylase (ATC) die Karbamyilasparaginsäure, die durch verschiedene Schritte zu Uridinmonophosphat umgewandelt wird. Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen kommt es zu einer vermehrten Bildung von Karbamyolphosphat durch Karbamyolphosphat-Synthetase I (CPS I). Dieser Karbamyolphosphatüberschuß kann durch die mitochondrielle Membran gelangen und an der Bildung von Uridin-5-monophosphat (UMP) teilnehmen. (LEVIN, ABRAHAM, OBERHOLZER, BURGESS, 1969; NATALE, TREMBLEY, 1969; BOURGET, NATALE, TREMBLEY, 1971).

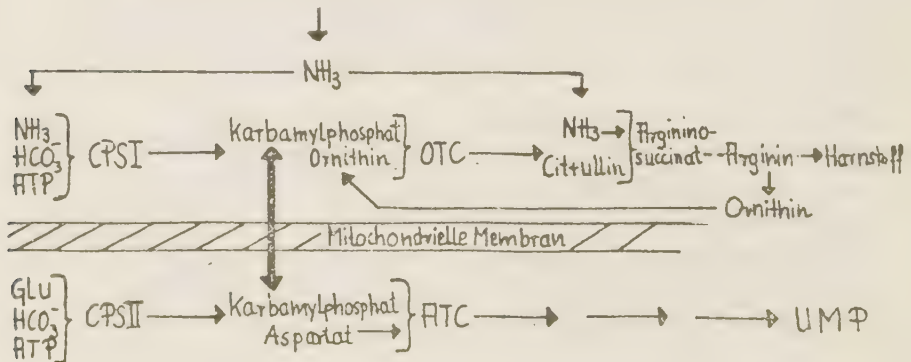


Abb.3 (In Anlehnung an SHAMBAUGH)

2.2.3. Orotazidurie infolge Fehlens der Ornithin-Transcarbamylase-Aktivität

Beim Menschen ist von erhöhter Orotsäure-Exkretion in Zusammenhang mit Störungen des Harnstoffzyklus berichtet worden, die zu Anreicherung von Ammoniak und/oder Karbamylphosphat führten. Diese Störungen schließen angeborene und erworbene Mängel der Ornithin-Transcarbamylase ein (CORBEEL, COLOMBO, VAN SANDE, WEBER, 1969; LEVIN, ABRAHAM, OBERHOLZER, BURGESS, 1969; SUNSHINE, LINDENBAUM, LEVY, FREEMAN, 1972; GOLDSTEIN, HOOGENRAAD, JOHNSON, FUKANGA, SWIEREZEWSKI, CANN, SUNSHINE, 1974; THALER, HOOGENRAAD, BOSWELL, 1974).

Bei Kindern mit einem Ornithin-Transcarbamylasemangel ist eine erhöhte Ausscheidung von Orotsäure, Uracil und Uridin festgestellt worden (LEVIN, ABRAHAM, OBERHOLZER, BURGESS, 1969).

Über eine Störung der Ornithin-Transcarbamylase und einem Anwachsen der Orotsäureausscheidung wurde auch im Zusammenhang mit dem Reye'schen Syndrom berichtet (THALER, HOOGENRAAD, BOSWELL, 1974; THALER, 1974). Diese gesteigerte Orotsäureausscheidung wird auf eine Störung der Aktivität der Ornithin-Transcarbamylase zurückgeführt.

2.2.4. Ernährungsbedingte Orotazidurie

Ratten, die mit Argininmangeldiät gefüttert wurden, schieden geringe Mengen Harnstoff, dafür aber vermehrt Orotsäure aus (MILNER, VISEK, 1973).

Arginase spaltet Arginin in Harnstoff und Ornithin, so daß ein Argininmangel einen Ornithinmangel zur Folge hat. Die Synthese von Citrullin mit Hilfe von Karbamylphosphat und OTC wird verhindert und Karbamylphosphat häuft sich an.

Bei Fehlen von Citrullin reichert sich Ammoniak an, da die Bildung von Argininosuccinat unterbunden ist. Dieser Ammoniak wird nun vermehrt von CPS I für die Erzeugung von Karbamylphosphat benutzt. Die entstandene Überfülle an Karbamylphosphat gelangt durch die Mitochondrienmembran und wird über die Pyrimidinsynthese verstoffwechselt. Als Folge davon entsteht ein Zuviel an Orotsäure.

Auf diese Weise wird auch die Orotazidurie bei Ratten erklärt, die unzureichend mit Ornithin und Citrullin gefüttert wurden (MILNER, VISEK, 1975).

Ebenso kann man eine Erhöhung der Orotsäureexkretion bei Ratten beobachten, denen ein mit Ammoniak angereichertes Futter verabreicht wurde (STATTER et al., 1974).

2.2.5. Arzneimittelbedingte Orotazidurien

2.2.5.1. 6-Azauridin

Eine Störung des Pyrimidinstoffwechsels, die der genetisch induzierten Orotazidurie ziemlich analog ist, kann man beim Menschen durch die Gabe von 6-Azauridin bewirken (CARDOSO, CALABRESI,

HANDSCHUHMACHER, 1961; FALLON, FREI, BLACK, SEEGBILLER, 1962). Dieses Medikament, das bei der Therapie von akuten Leukämien, Psoriasis und Mycosis fungoides verwendet wird, führt zu einem Anstieg der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin (CARDOSO, CALABRESI, HANDSCHUHMACHER, 1961; MILSTEIN, 1963). Nach einer enzymatischen Umformung zu 6-Azauridin-5-monophosphat ist ein spezifischer kompetitiver Hemmstoff für die Orotidyldekarboxylase entstanden, der die Dekarboxylierung von Orotidin-5-phosphat zu Uridin-5-phosphat verhindert (HANDSCHUHMACHER, 1960).

Die angestiegene renale Ausscheidung von Orotidin ist das Ergebnis der vermehrten Bildung von Orotidin aus Orotidin-5-phosphat bedingt durch die Hemmung der Orotidin-5-decarboxylase. Die Erhöhung der renalen Exkretion von Orotsäure wird zum Teil der Hemmung der Orotat-phosphoribosyltransferase durch die erhöhte Konzentration von Orotidin-5-phosphat, zum anderen Teil der Wirkung von 6-Azauridin-5-phosphat zugeschrieben (FALLON, FREI, BLACK, SEEGBILLER, 1962).

2.2.5.2. Allopurinol (Oxipurinol)

Allopurinol führt über eine Hemmung der Xanthinoxidase zu einer Verminderung des Harnsäurespiegels. Die harnsäuresenkende Wirkung von Allopurinol wurde durch zahlreiche Autoren bestätigt und führte zum Einsatz dieser Verbindung in der Gichtbehandlung (ZÖLLNER, 1966; ZÖLLNER, SCHATTENKIRCHNER, 1967).

Im Jahre 1970 wurde erstmals über eine Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol berichtet. Bei Gabe von Allopurinol beobachtete man einen Anstieg der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin (FOX et al., 1970; KELLEY et al., 1970; KELLEY, WYNGAARDEN, 1970). Ursache ist eine Hemmung der Orotidyldecarboxylase durch Allopurinolribonukleotide (KELLEY et al., 1970). Untersuchungen von BEARDMORE und KELLEY (1971) ergaben, daß zwei Oxipurinolmetaboliten, nämlich das durch Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) katalysierte 1-Oxipurinolribonukleotid und das durch Orotatphosphoribosyltransferase (OPRT) katalysierte 7-Oxipurinolribonukleotid an der Hemmung der Orotidyl-Dekarboxylase beteiligt sind.

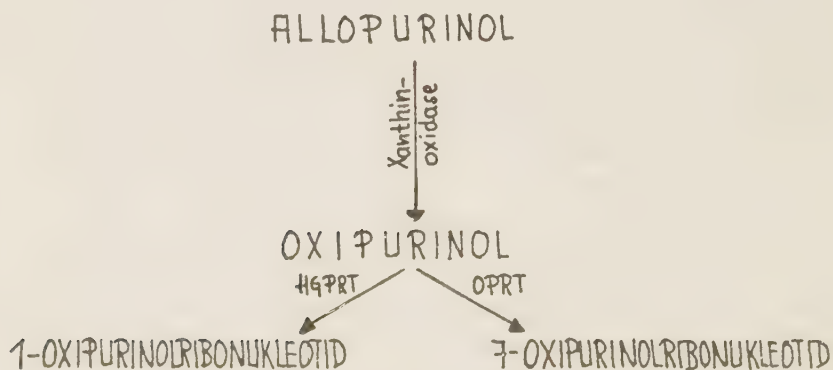


Abb.4 (In Anlehnung an GRÖBNER und ZÖLLNER, 1975)

HGPRT = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase

OPRT = Orotat-Phosphoribosyl-Transferase

2.2.5.3. Barbitursäure

Barbitursäure hemmt kompetitiv die Dihydroorotat-Dehydrogenase, die Uridin-Phosphorylase und die Orotatphosphoribosyl-Transferase. Das Ribotid der Barbitursäure hemmt die Uridin-5-monophosphat-Kinase und ist ein kompetitiver Hemmer der Orotidyl-Dekarboxylase, dem letzten Enzym der de novo Synthese des Pyrimidinstoffwechsels.

Ebenso ist die Phenobarbitursäure ein schwacher, nicht kompetitiver Hemmer der Orotidyldekarboxylase (POTVIN, STERN, MAY, LAM, KROOTH, 1977).

3. METHODEN

3.1. Material

1). Isotope:

NEC-086H Sodium Bicarbonate
54,0 mCi/mmol (^{14}C)

New England Nuclear Corporation

NEC-073H Orotic Acid
Hydrate ($6\text{-}^{14}\text{C}$)
46,9 mCi/mmol

NEC-167 Uridine
($2\text{-}^{14}\text{C}$)
52,4 mCi/mmol

2). Purine:

Adenosin-5-monophosphat (AMP)
Dinatriumsalz, kristallisiert
 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_7\text{PNa}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ MG 499,2
Boehringer, Mannheim

A d e n o s i n

kristallisiert

$C_{10}H_{13}N_5O_4$ MG 367,2

Boehringer, Mannheim

A d e n i n

kristallisiert MG 135,1

Boehringer, Mannheim

G u a n o s i n

kristallisiert MG 283,2

$C_{10}H_{13}N_5O_5$

Boehringer, Mannheim

G u a n i n

2-Aminohypoxanthin $C_5H_5N_5O$

Merck, Darmstadt

3). N a t r i u m p h e n y l a e t h y l -
b a r b i t u r i c u m (NaPAB)

MG 254,22

Caesar und Lorenz, Hilden

4). P. B. S.

(DULBECCO'S) (1x)

Ca und Mg Free

NaCl 8g/l, KCl 2g/l, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 1,45g/l

KH_2PO_4 0,2g/l

5). A q u a d e s t. (Kontrollwert), mit ca. 200 ul
1n NaOH auf PH 12 eingestellt

6). 30%ige K O H

7). 0,1 N a O H

- 8). 1,5 n P e r c h l o r s ä u r e
- 9). 10%ige T r i c h l o r e s s i g s ä u r e (TCA)
- 10). N a a - O r o t a t (PH 12 mit NaOH eingestellt)
- 11). B r a y ' s S o l u t i o n
Fa. New England Nuclear Corporation
- 12). R P M - I - M e d i u m
ohne NaHCO_3 , mit 200 mM Glutamin,
Fa. Seromed

3.2. Präparation der Lymphozytenkulturen

Venenblut von Gesunden wurde heparinisiert und zwei Stunden lang bei 37°C im Brutschrank abgestellt.

Der die Lymphozyten enthaltende Überstand wurde im RPM I - Medium suspendiert. Im Medium waren enthalten:

50 U/ml fetales Kälberserum

50 U/ml Penicillin

50 µg/ml Streptomycin

2,4 µg/ml Phytohämagglutinin (Fa. Wellcome)

Die Lymphozyten wurden anschließend wenigstens 48 Stunden bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für die Untersuchungen wurden 2 - 6 Tage alte Zellen verwendet.

3.3. Arbeitsgang

3.3.1. Einbau von Bicarbonat-¹⁴C in Orotsäure

Der Einbau von Bicarbonat-¹⁴C in Orotsäure wurde in Anlehnung an die Methode von TREMBLAY und Mitarbeiter (1977) bestimmt.

In je ein Kunststoffreagenzgefäß wurden mit einer Eppendorfpipette zuerst 50 µl einer 0,005, 0,05, 0,5 mM Purin-, bzw. einer 0,5, 5, 50 mM NAPAB-Lösung (Aqua dest., PH 12) und danach zusätzlich in jedes Gefäß 500 µl der Zellsuspension pipettiert.

In 500 µl der Suspension waren 0,2 bis 0,6 x 10⁶ Zellen enthalten. Die Zählung der Lymphozyten erfolgte mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer und Coulter Counter.

Unter dem Abzug erfolgte die Zugabe von 20 µCi Bicarbonat-¹⁴C (spez. Aktivität 54 mCi/mmol NEN).

Das Reagenzgefäß wurde sofort verschlossen und bei 37°C unter leichtem Schwenken 2 Stunden lang inkubiert. Kontrollen enthielten keine Substanz.

Ebenfalls unter dem Abzug wurde die Reaktion dann durch Zugabe von 200 ul 1,5 N Perchlorsäure gestoppt und die Substanzen durch ca. 2 Sekunden langes Mixen homogenisiert. Die Verschlüsse der Reagenzgefäße wurden unter dem Abzug gegen ODC-Gummistopfen (Fa. Vetter) ausgewechselt. Sie ermöglichten die Befestigung eines Kunststoffgefäßes, das 400 ul 30%iger KOH und einen Streifen Filterpapier enthielt, um nichtverbrauchtes $^{14}\text{CO}_2$ aufzunehmen (Abb.5).

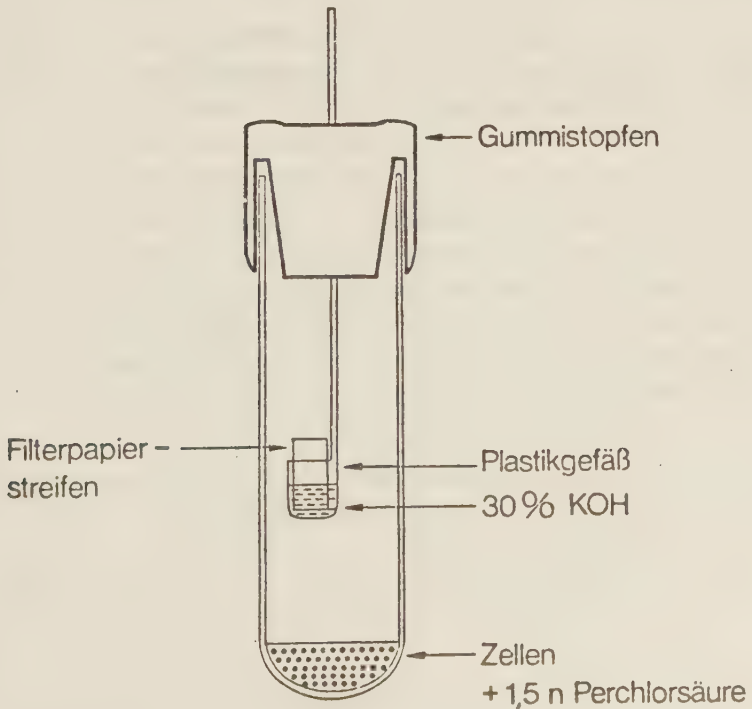


Abb.5

Bei 37°C und unter leichtem Schwenken wurde 30 Minuten lang inkubiert, danach unter dem Abzug die Stopfen entfernt und die Reagenzgefäße bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 3000 U/min in der Haereus Zentrifuge zentrifugiert.

500 ul des Überstandes und die gleiche Menge kalter Na-Orotatlösung PH 12 (mit 1N NaOH eingestellt) wurden in Eppendorfgefäße pipettiert, anschließend gut vermischt und im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt.

Abkühlung und PH-Änderung führten zur Kristallisation von Na-Orotat gemeinsam mit der aus Bicarbonat-¹⁴C entstandenen Orotsäure -6-¹⁴C. Anschließend wurde in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Vom Überstand wurden 900 ul abpipettiert und 100 ul belassen.

Das Waschen der Kristalle erfolgte jeweils mit 500 ul eisgekühltem Aqua dest., anschließendem Mixen, Zentrifugieren und Abpipettieren von 500 ul, erneuter Zugabe von eisgekühltem Aqua dest. usf., bis der Überstand nicht mehr radioaktiv war.

Schließlich wurde der gesamte Überstand abpipettiert, die Orotatkristalle in 200 ul 1n NaOH und mit 10 ml Bray's Solution zur Messung in den Packard Scintillation Counter (60% Effizienz) eingebracht. Im gemessenen Zeitraum (90 Min.) war der Einbau linear bezüglich Zeit und Zellzahl.

3.3.2. Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C bzw. Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren.

In je ein Eppendorfreagenzgefäß wurden mit einer Eppendorfpipette zuerst 50 µl einer 0,005, 0,05, 0,5 mM Purin-, bzw. einer 0,5, 5, 50 mM NaPAB-Lösung (Aqua dest., PH 12) und danach zusätzlich in jedes Gefäß 500 µl der Zellsuspension pipettiert.

In 500 µl der Suspension waren 0,2 bis 0,6 x 10⁶ Zellen enthalten.

Unter dem Abzug erfolgte die Zugabe von 2 µCi Orotsäure-6-¹⁴C, bzw. 0,04 µCi Uridin-2-¹⁴C. Die Eppendorfgeläße wurden sofort verschlossen und bei 37°C unter leichtem Schwenken 2 Stunden lang inkubiert. Kontrollen enthielten keine Substanz.

Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 800 µl eiskalter P.B.S. gestoppt. In einer Kühlzentrifuge wurde bei 1100 U/min. 5 Minuten lang zentrifugiert und anschließend mit einer Eppendorfpipette 500 µl des Überstandes abpipettiert.

Das Pellet wurde zweimal mit 400 µl 10%iger TCA gewaschen, dann homogenisiert, 0,5 Minuten in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert und der Überstand mit einer Eppendorfpipette entfernt.

Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der Überstand nicht mehr radioaktiv war.

Zuletzt wurde der gesamte Überstand abpipettiert, das Pellet in 500 µl 0,1 n NaOH gelöst und mit 10 ml Bray's Solution zur Messung in den Packard Scintillation Counter (60% Effizienz) eingebracht. Im gemessenen Zeitraum (90 Min.) war der Einbau linear bezüglich Zeit und Zellzahl.

4. ERGEBNISSE

Der Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure, von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren und von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren war über den gemessenen Zeitraum (60 Min.) linear.

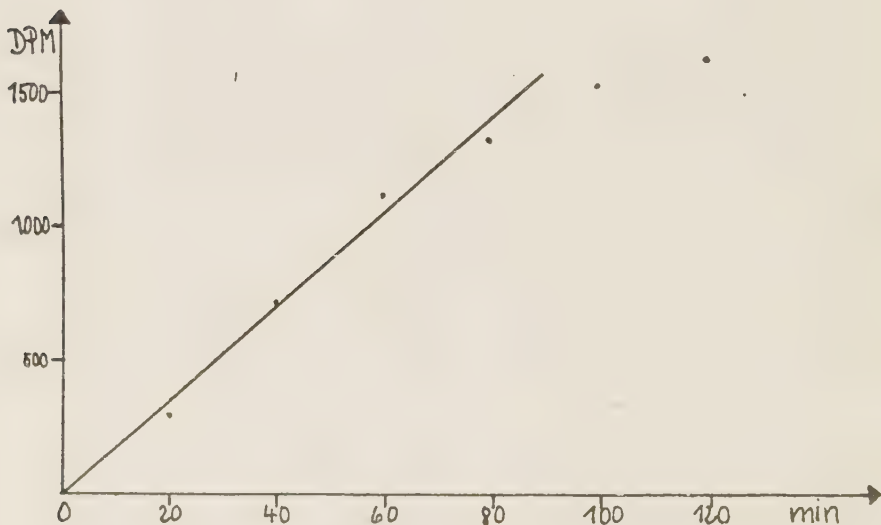


Abb.6. Zeitkurve. Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure von menschlichen Lymphozytenkulturen. Die Reaktionen wurden jeweils nach 20, 40, 60, 80, 100, 120, min (wie unter METHODEN beschrieben) gestoppt. Jeder Punkt entspricht einem Doppelwert.

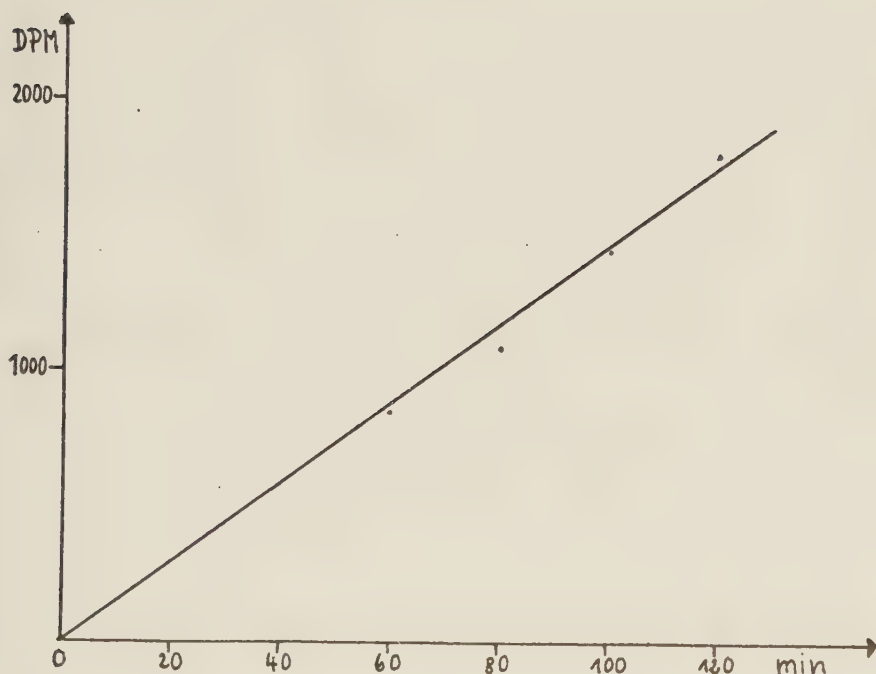


Abb.7. Zeitkurve. Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren von menschlichen Lymphozytenkulturen. Die Reaktion wurde jeweils nach 20, 40, 60, 80, 100, 120 min gestoppt. Jeder Punkt entspricht einem Doppelwert.

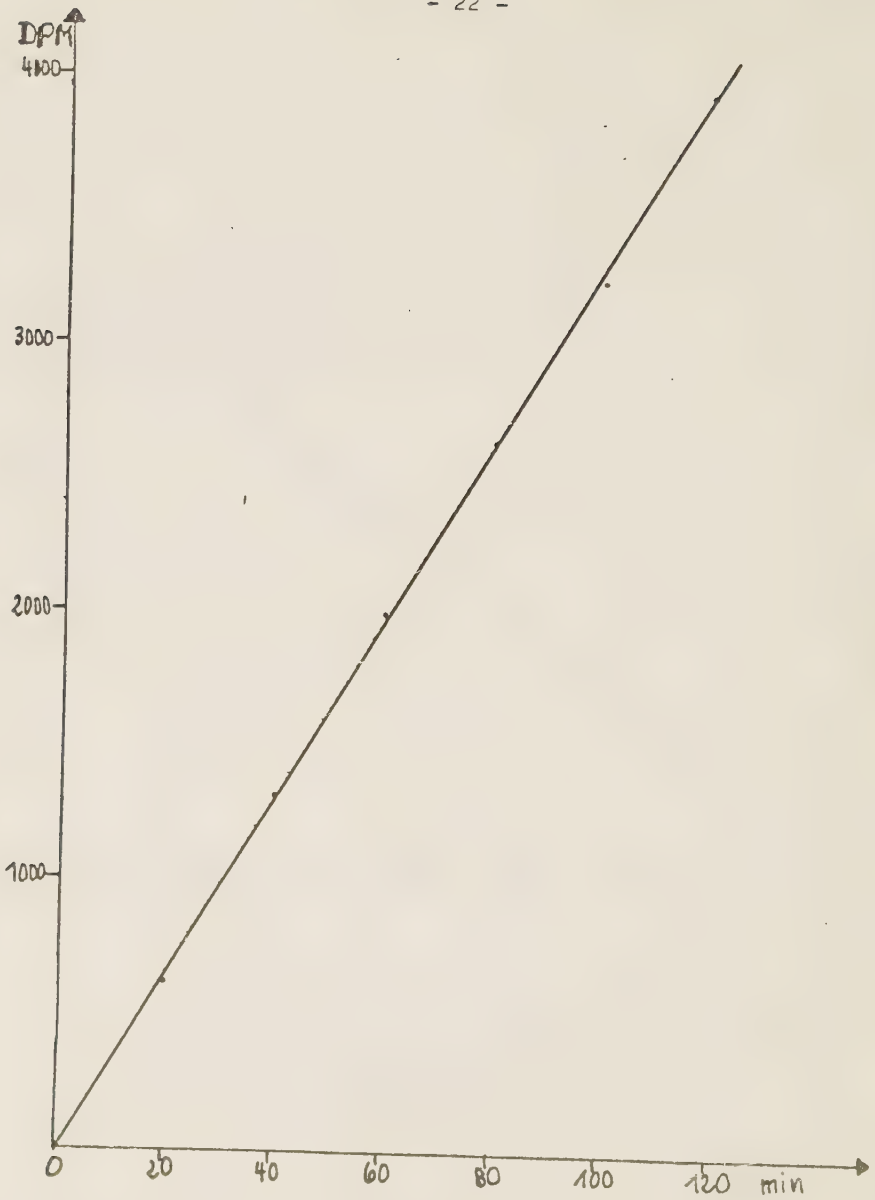


Abb.8. Zeitkurve. Einbau von Uridin in Nukleinsäuren von menschlichen Lymphozytenkulturen. Die Reaktion wurde jeweils nach 20, 40, 60, 80, 100, 120 min gestoppt. Jeder Punkt entspricht einem Doppelwert.

Der Einfluß von Adenin auf den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure ist in Abbildung Nr.9, bzw. Tabelle 1 dargestellt:

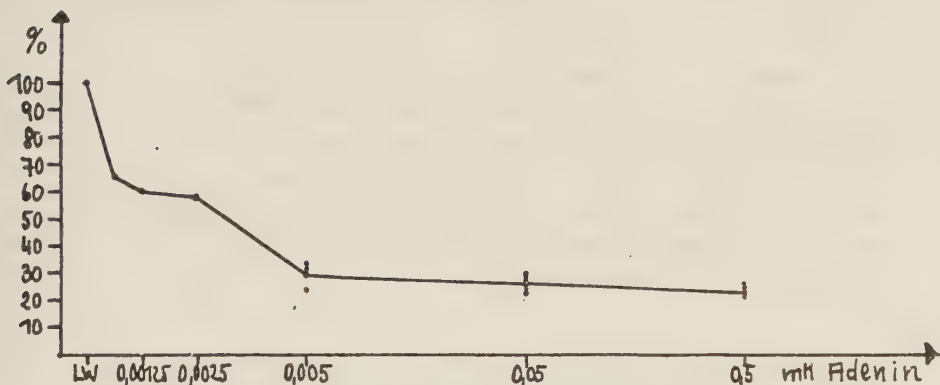


Abb.9. Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Adenin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 4 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tab.1 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen zwischen 2700 und 5100 DPM.

		I	II	III	IV
		Prozent	Prozent	Prozent	Prozent
Substanzen		Einbau	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100
Adenin	0,5 mM	22	24	22	23
	0,05 mM	23	27	23	27
	0,005 mM	23	32	31	
	0,0025 mM	58			
	0,00125 mM	61			
	0,000625 mM	66			

Tab.1. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Adenin auf den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure, gemessen in vier Versuchsansätzen (I bis IV). Angaben

in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag zwischen 2700 und 5100 DPM.

Alle verwendeten Konzentrationen führen zu einer Verminderung des Bicarbonateinbaus. Diese Verminderung wird bereits bei physiologischen Konzentrationen im Nanomol- bis Mikromolbereich erreicht. Sie ist zwischen 625 Nanomol und 5 Mikromol/l dosisabhängig. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu keiner weiteren Verminderung mehr.

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Adenin auf den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren ist in Abb.10, bzw. Tab.2 dargestellt:

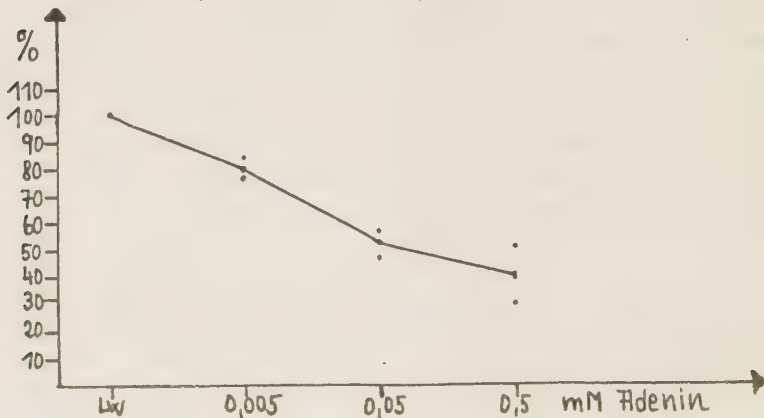


Abb.10. Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Adenin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 5 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tab.2 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die

Mittelwerte der Kontrollen lagen zwischen 3000 und 3500 DPM.

		I	II	III	IV	V
		Prozent	Prozent	Prozent	Prozent	Prozent
	Substanzen	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100	100
Adenin	0,5 mM	30	42	51	39	41
	0,05 mM	47	57			
	0,005 mM	84	76			

Tab.2. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Adenin auf den Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen in 5 Versuchsansätzen (I bis V). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag zwischen 3000 und 3500 DPM.

Die Ergebnisse zeigen, daß Adenin in einer Konzentration von 0,005 mM - 0,5 mM den Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C in Nukleinsäuren dosisabhängig hemmt. Um den zweiten Teil der Pyrimidinsynthese um etwa den gleichen Prozentsatz (30%) zu hemmen wie den ersten Teil (25%), ist also eine um 2 Zehnerpotenzen größere Adeninkonzentration notwendig.

Den Einfluß verschiedener Konzentrationen von Adenin auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren zeigen Abbildung 11 und Tabelle 3:

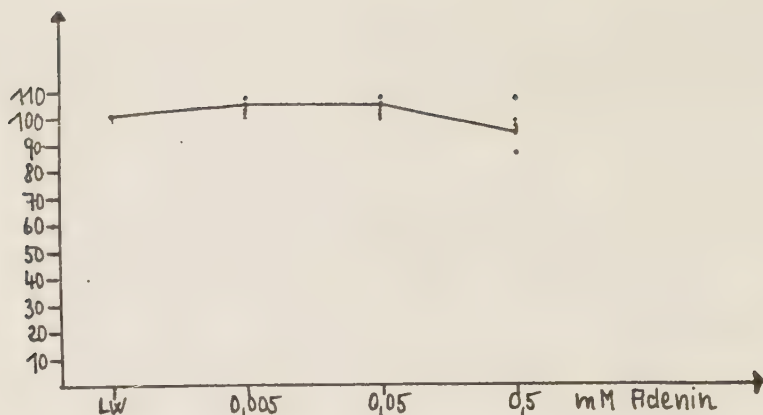


Abb. 11. Der Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Adenin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 3 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 3 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen zwischen 9800 und 12000 DPM.

		I	II	III
		Prozent	Prozent	Prozent
Substanzen		Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100
Adenin	0,5 mM	84	106	94
	0,05 mM	100	106	101
	0,005 mM	102	105	102

Tab. 3. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Adenin auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen an drei Versuchsansätzen (I bis III).

Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag zwischen 9780 und 11150 DPM.

Der Uridineinbau in Nukleinsäuren wird durch Adenin in den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflusst. Dies bedeutet, daß der Salvage pathway durch Adenin in unserer Versuchsanordnung nicht beeinflusst wird. Darüber hinaus ist dies der Nachweis, daß die Verminderung des Bicarbonat- und des Orotsäureeinbaus durch Adenin nicht toxischer Natur ist.

Der Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Adenosin ist in Abbildung 12 und Tabelle 3 dargestellt:

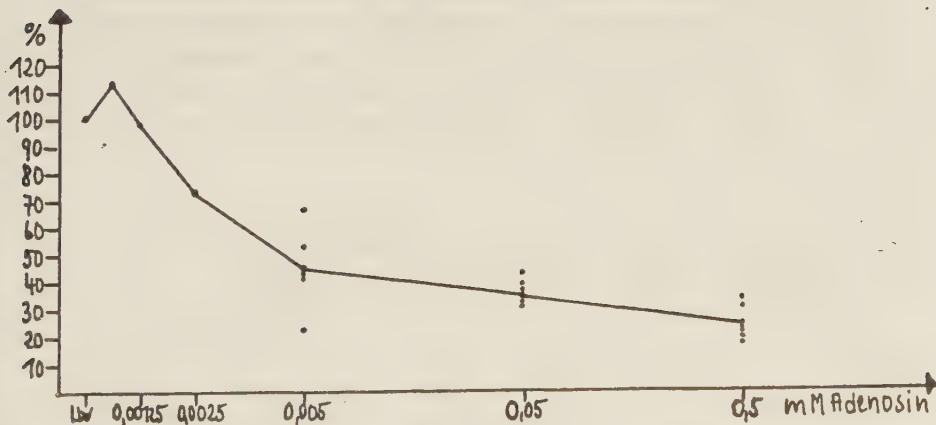


Abb. 12. Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Adenosin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenosin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 6 getrennten Versätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 4 darge-

stellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen zwischen 4600 und 5700 DPM.

		I .	II .	III .	IV .	V .	VI
		Prozent	Prozent	Prozent	Prozent	Prozent	Prozent
	Substanz.	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100	100	100
Adenosin	0,5mM	33	17	23	22	30	19
	0,05 mM	35	21	34	39	43	
	0,005 mM	22	42	69	43	53	
	0,0025 mM	73					
	0,00125 mM	98					

Tab.4. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Adenosin auf den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure, gemessen in 6 Versuchsansätzen (I bis VI). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenosin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag zwischen 4600 und 5700 DPM.

Adenosin führt in physiologischen Konzentrationen im Mikromolbereich zu einer deutlichen Hemmung des Bicarbonat- ^{14}C -Einbaus. Konzentrationen über 5 μM bewirken keine weitere Steigerung der Hemmwirkung mehr.

Abbildung 13 und Tabelle 5 zeigen den Einfluß von Adenosin auf den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren:

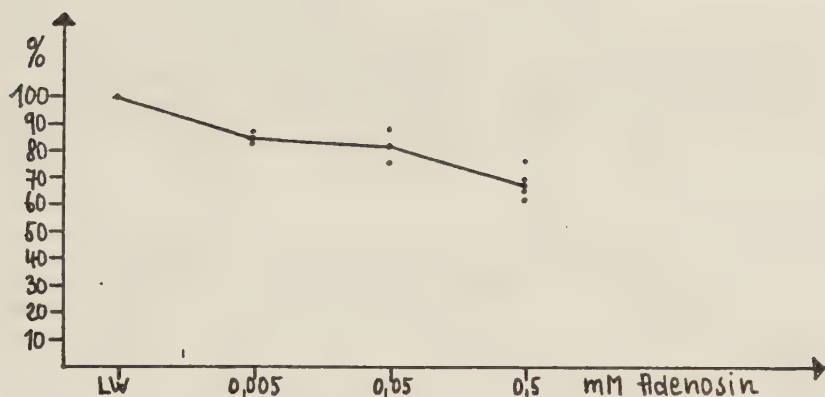


Abb.13. Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Adenosin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenosin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 4 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 5 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen zwischen 2000 und 3000 DPM.

		I	II	III	IV
		Prozent	Prozent	Prozent	Prozent
Substanzen		Einbau	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100
Adenosin	0,5 mM	62	77	67	71
	0,05 mM	88	76		
	0,005 mM	87	83		

Tab.5. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Adenosin auf den Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen in 4 Versuchsansätzen (I bis IV). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenosin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag zwischen 2000 und 3000 DPM.

Adenosin führt in höheren Konzentrationen (0,005 mM, 0,05 mM, 0,5 mM) zu einer Hemmung des Einbaus von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren. Die Hemmung ist geringer als im ersten Teil der Pyrimidinsynthese.

Der Uridin-2- ^{14}C -Einbau in Nukleinsäuren in Anwesenheit von Adenosin ist in Abbildung 14 und Tabelle 6 dargestellt:

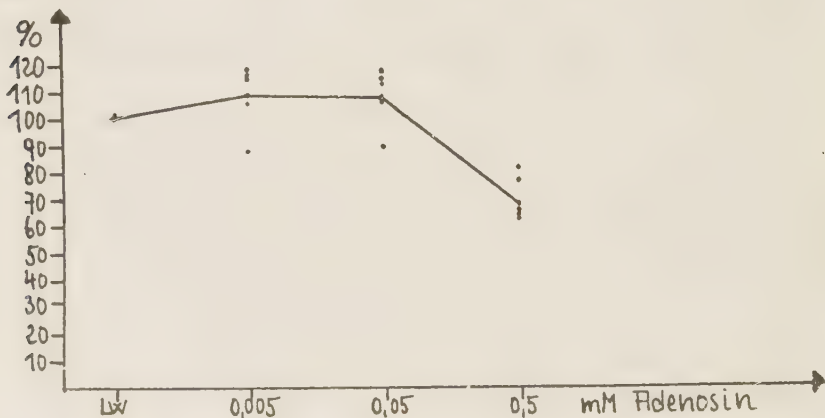


Abb.14. Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren in Anwesenheit von Adenosin unterschiedlicher Konzentration. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenosin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 6 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 6 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen im Bereich von 2500 DPM.

		I	II	III	IV	V	VI
		%	%	%	%	%	%
Substanzen	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100	100	100
Adenosin	0,5 mM	62	63	81	76	65	65
	0,05 mM	112	114	89	117	107	
	0,005mM	118	116	87	105	115	

Tab.6. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Adenosin auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen in 6 Versuchsansätzen (I bis VI). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Adenosin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag im Bereich von 2500 DPM.

Niedrige Adenosinkonzentrationen (0,005mM, 0,05mM) führen zu einem gering vermehrten Einbau von Uridin-2-¹⁴C. Die höhere Konzentration von 0,5 mM führt dagegen zu einem verminderten Uridin-2-¹⁴C-einbau. Dies spricht dafür, daß Adenosin in dieser Konzentration toxisch auf menschliche Lymphozythen wirkt. Ein Abfall des Einbaus von Bicarbonat-¹⁴C und Orotsäure-2-¹⁴C bei diesen Konzentrationen ist demnach als toxische Wirkung anzusehen und nicht als physiologischer Regulationsmechanismus.

Den Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanin auf den Einbau von Bicarbonat-¹⁴C in Orotsäure zeigen Abbildung 15 und Tabelle 7:

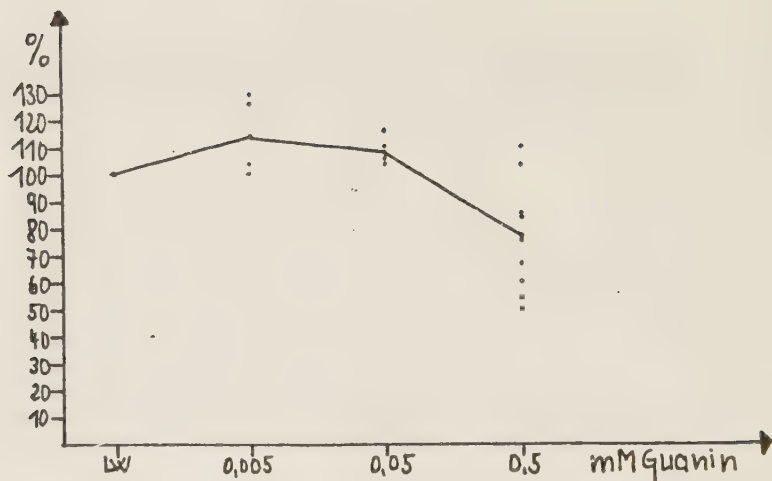


Abb.15. Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Guanin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 9 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 7 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen im Bereich von 5700 DPM.

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
Subst.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.
Kontrol.	keine	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Guanin	0,5 mM	103	110	50	67	60	55	77	85	84
	0,05 mM	116	110	106	104					
	0,005 mM	131	127	104	100					

Abb.7. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanin auf den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure, gemessen in 9 Versuchsansätzen (I bis IX). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwerte der Kontrollen lag im Bereich von 5700 DPM.

Guanin vermindert in einer Konzentration von 0,5 mM den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure, während es in niedrigeren Konzentrationen keinen Einfluß hat, bzw. den Einbau gering vermehrt.

Der Einfluß von Guanin auf den Einbau von Orotsäure- $6\text{-}^{14}\text{C}$ in Nukleinsäuren ist in Abbildung 16 und Tabelle 8 dargestellt:

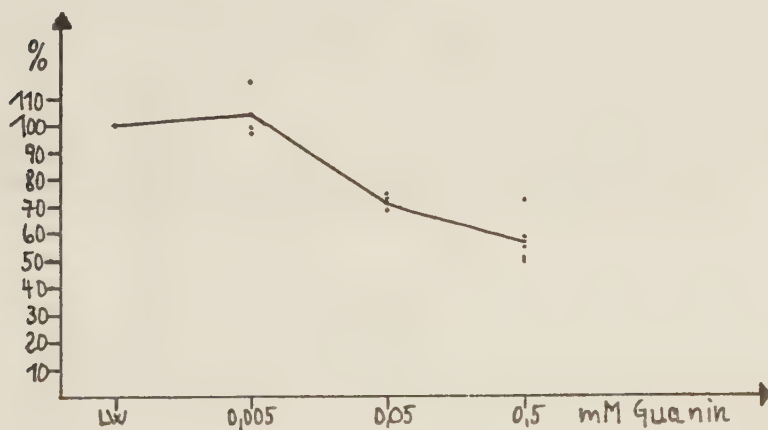


Abb.16. Einbau von Orotsäure- $6\text{-}^{14}\text{C}$ in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Guanin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 5 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 8 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen zwischen 2000 und 2500 DPM.

		I	II	III	IV	V
	Substanzen	Prozent Einbau	Prozent Einbau	Prozent Einbau	Prozent Einbau	Prozent Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100	100
Guanin	0,5 mM	55	51	59	73	50
	0,05 mM	74	69	72		
	0,005 mM	116	99	97		

Tab.8: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanin auf den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren, gemessen in 5 Versuchsansätzen (I bis V). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag zwischen 2000 und 2500 DPM.

Der Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C ist dementsprechend in einer Konzentration von 0,05 und 0,5 mM vermindert.

Abbildung 17 und Tabelle 9 zeigen den Einfluß von Guanin auf den Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren:

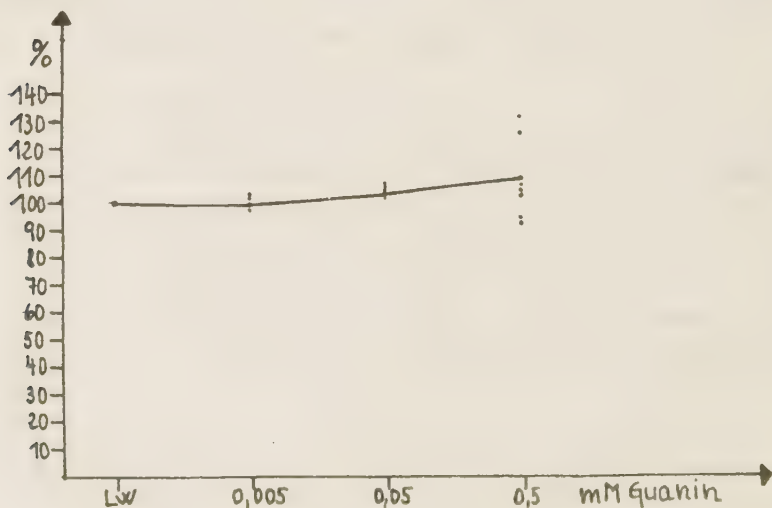


Abb.17. Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren in

Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Guanin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 7 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 9 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen zwischen 3600 und 8400 DPM.

		I	II	III	IV	V	VI	VII
		%	%	%	%	%	%	%
Substanz.		Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.	Einb.
Kontrol.	keine	100	100	100	100	100	100	100
Guanin	0,5 mM	106	94	92	102	125	104	131
	0,05 mM	101	106	102	101	103	107	
	0,005 mM	91	97	102	90	108		

Tab.9. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanin auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen in 7 Versuchsansätzen (I bis VII). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag zwischen 3600 und 8400 DPM.

Der Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren ist durch Guanin nicht verändert.

Abbildung 18 und Tabelle 10 zeigen den Einfluß von Guanosen auf den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure.

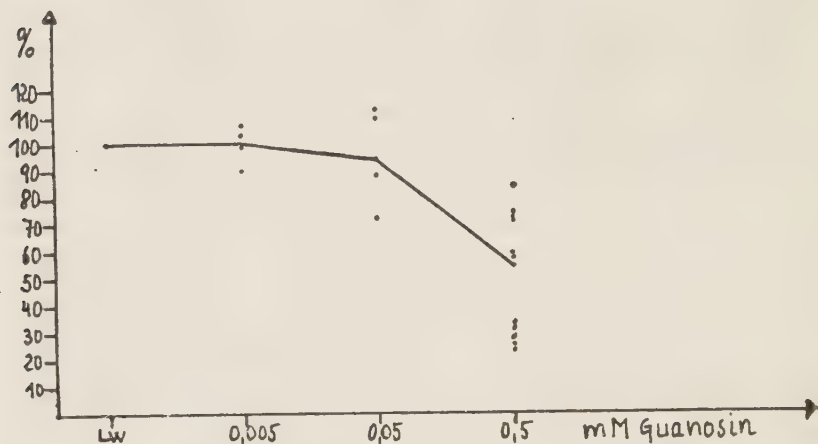


Abb.18. Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentration von Guanosen. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanosen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 11 getrennten Versuchsan-sätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 10 darge-stellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifach-bestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen im Bereich von 5000 DPM.

(Abkürzungen: Kontrolle = Kon., Guanosen = Gua., Substanzen = Subst, Einbau = Einb.)

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Subst.Einb.											
Kon. -	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Gua.0,5mM	24	74	71	83	59	27	23	31	31	58	72
0,05mM	109	112	72	88							
0,005mM	103	107	91	99							

Tab.10. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanosen auf den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure

gemessen in 11 Versuchsansätzen (I bis XI). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanosin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag im Bereich von 5000 DPM.

Guanosin hemmt in einer Konzentration von 0,5 mM den Bicarboneinbau.

Der Einfluß von Guanosin auf den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren ist in Abbildung 19 und in Tabelle 11 dargestellt:

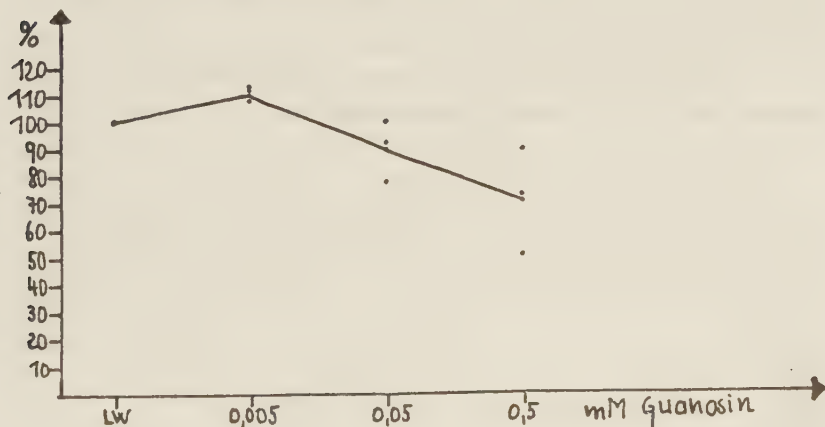


Abb.19. Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Guanosin. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanosin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 3 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 11 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen im Bereich von 3000 DPM.

		I	II	III
	Substanzen	Prozent Einbau	Prozent Einbau	Prozent Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100
Guanosin	0,5 mM	73	90	51
	0,05 mM	92	100	78
	0,005 mM	112	108	110

Tab.11. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanosin auf den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren, gemessen in 3 Versuchsansätzen (I bis III). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanosin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag im Bereich von 3000 DPM.

Nur hohe Konzentrationen von Guanosin (0, 5 mM) hemmen den Orotsäureeinbau in Nukleinsäuren.

Abbildung 20 und Tabelle 12 zeigen den Einfluß von Guanosin auf den Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren:

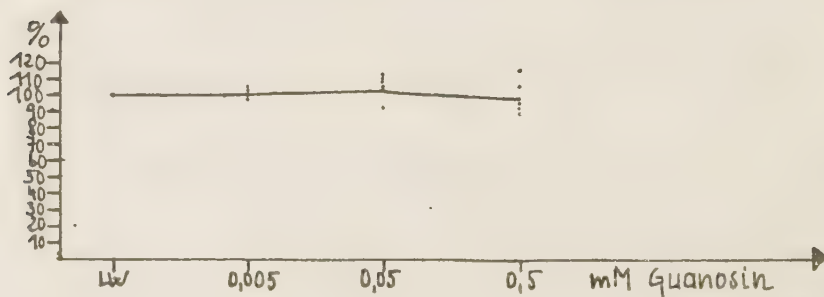


Abb.20. Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Guanosin.

Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanosin. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 5 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 12 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen im Bereich von 5000 DPM.

		I	II	III	IV	V
		Prozent	Prozent	Prozent	Prozent	Prozent
	Substanzen	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100	100
Guanosin	0,5 mM	91	87	96	115	104
	0,05 mM	107	102	106	92	112
	0,005 mM	98	100	100	99	103

Tab.12. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Guanosin auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen in 5 Versuchsansätzen (I bis V). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein Guanosin. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag im Bereich von 5000 DPM.

Der Uridineinbau in Nukleinsäuren bleibt weitgehend unbeeinflusst.

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von NaPAB auf den Einbau von Bicarbonat-¹⁴C in Orotsäure ist in Abbildung 21 und in Tabelle 13 dargestellt:

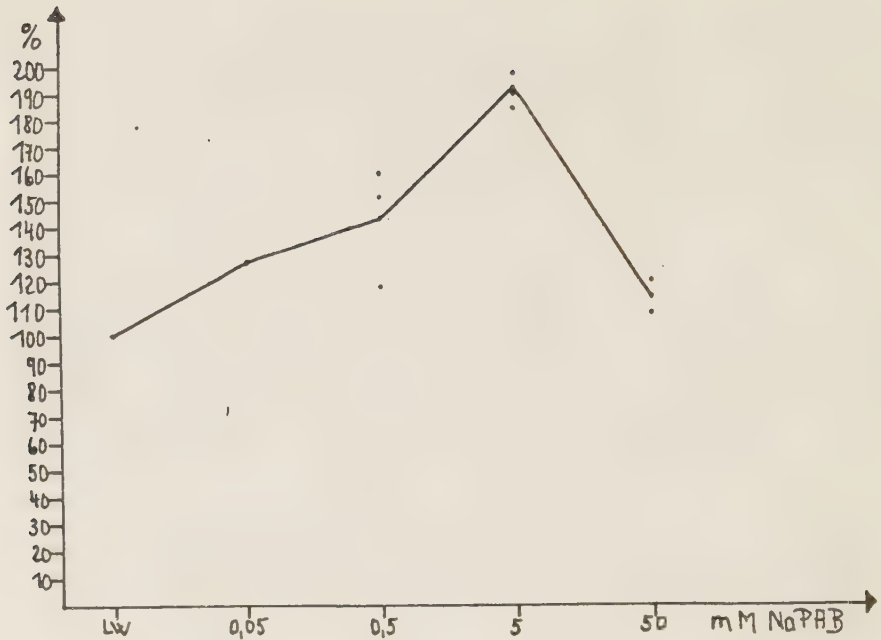


Abb.21. Der Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von NaPAB. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein NaPAB. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 3 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 13 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrolle lagen im Bereich von 2000 DPM.

		I	II	III
		Prozent	Prozent	Prozent
	Substanzen	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100
NaPAB	50 mM		108	120
	5 mM	184	190	197
	0,5 mM	151	118	160
	0,005 mM	127		

Tab.13. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von NaPAB auf den Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure, gemessen in 3 Versuchsansätzen (I bis III). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein NaPAB. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag im Bereich von 2000 DPM.

Eine Konzentration von 5 mM NaPAB führt zu einem Anstieg des Bicarbonateinbaus, der sich gegenüber den Kontrollen nahezu verdoppelt hat. 50 mM führen dagegen zu einem verminderten Bicarbonateinbau. Dies ist wahrscheinlich auf eine toxische Wirkung hoher NaPAB Konzentrationen zurückzuführen, da sowohl Orotsäure- als auch Uridineinbau in dieser Konzentration abnehmen.

Abbildung 22 und Tabelle 14 zeigen den Einfluß von NaPAB auf den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in Nukleinsäuren:

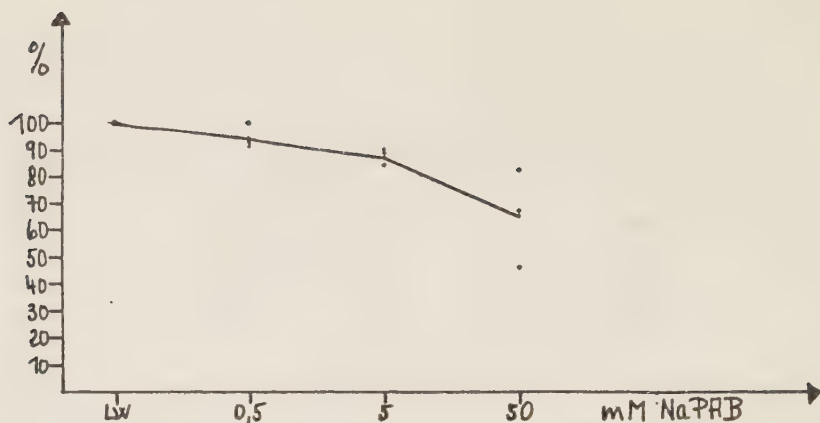


Abb.22. Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von NaPAB. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein NaPAB. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 3 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind Tabelle 14 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen im Bereich von 11000 DPM.

		I	II	III
		Prozent	Prozent	Prozent
Substanzen		Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100
NaPAB	50 mM	67	46	82
	5 mM	88	89	84
	0,5 mM	91	90	100

Tab.14. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von NaPAB auf den Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen in 3 Versuchsansätzen (I bis III). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein NaPAB. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag im Bereich von 11000 DPM.

NaPAB hemmt in einer Konzentration von 50 mM den Orotsäure-6- ^{14}C -Einbau, was wahrscheinlich toxisch bedingt ist.

Abbildung 23 und Tabelle 15 zeigen den Einfluß von NaPAB auf den Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren:

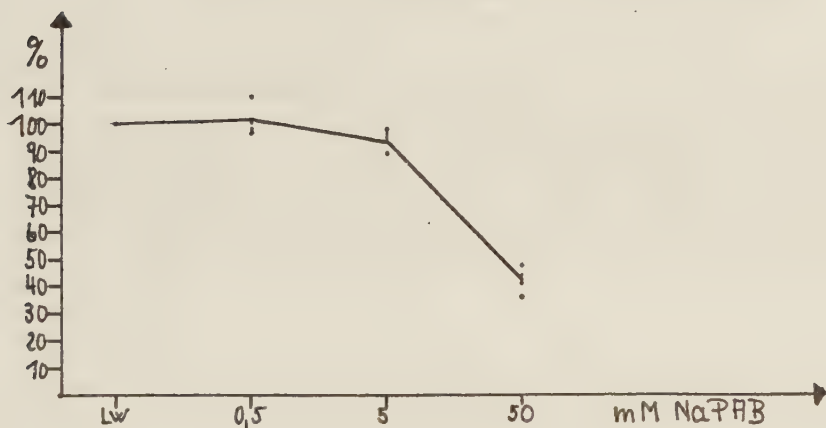


Abb.23. Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nukleinsäuren in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von NaPAB. Angaben in Prozent der Kontrollen. Kontrollen enthielten kein NaPAB. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 1 bis 4 getrennten Versuchsansätzen. Die Einzelwerte sind in Tabelle 15 dargestellt. Jeder Wert entspricht hierbei einer Dreifachbestimmung. Die Mittelwerte der Kontrollen lagen im Bereich von 13000 DPM.

		I	II	III	IV
		Prozent	Prozent	Prozent	Prozent
	Substanzen	Einbau	Einbau	Einbau	Einbau
Kontrolle	keine	100	100	100	100
NaPAB	50 mM	42	42	48	36
	5 mM	98	89	95	97
	0,5 mM	110	100	96	97

Tab.15. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von NaPAB auf den Einbau von Uridin-2-¹⁴C in Nukleinsäuren, gemessen in 4 Versuchsansätzen (I bis IV). Angaben in Prozent gegenüber den Kontrollen. Kontrollen enthielten kein NaPAB. Jeder Wert entspricht einer Dreifachbestimmung. Der Mittelwert der Kontrollen lag im Bereich von 13000 DPM.

NaPAB hemmt in einer Konzentration von 50 mM den Uridin-2-¹⁴C-Einbau, was wahrscheinlich auf eine toxische Wirkung zurückzuführen ist.

5. DISKUSSION

Unsere Ergebnisse zeigen, daß Adenin, Adenosin, Guanin, Guanosin und Na-Barbitursäure zu einer dosisabhängigen Verminderung des Orotsäure-6- ^{14}C -Einbaus in Nukleinsäuren führen. Die genannten Substanzen bewirken eine Hemmung des zweiten Teils der Pyrimidinsynthese.

Frühere Untersuchungen (BANHOLZER, 1980, 1981) haben ergeben, daß Oxipurinol ebenfalls zu einer dosisabhängigen Verminderung des zweiten Teils der Pyrimidinsynthese führt.

Der Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure ist in Anwesenheit von Oxipurinol und Na-Barbitursäure vermehrt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß es bei unvermindertem ersten Teil der Pyrimidinsynthese zu einer Vergrößerung des Orotsäurepools vor dem Hindernis kommt.

Diese Zunahme des Orotsäurepools in Anwesenheit von Oxipurinol oder Na-Barbitursäure steht in guter Übereinstimmung mit der in vivo beobachteten Orotazidurie bei oraler Verabreichung von Allopurinol.

Die Anwesenheit von Adenin, Adenosin, Guanin oder Guanosin führten trotz Hemmung des zweiten Teils der Pyrimidinsynthese nicht zu einer Anhäufung von Orotsäure-6- ^{14}C aus Bicarbonat- ^{14}C . Es kam im Gegenteil zu einer Verminderung von Orotsäure-6- ^{14}C im Kokristallisat.

Dies spricht für eine Hemmung des ersten Teils der Pyrimidinsynthese durch die Purinbasen und -nukleoside. Hierbei muß die Hemmung im ersten Teil stärker sein als im zweiten. Diese Hemmung des ersten Teils der Pyrimidinsynthese erklärt gut die in vivo beobachtete Verminderung der Orotazidurie durch Purine.

Als regulierender Faktor kommt PRPP in Frage, das an zwei Stellen der Pyrimidinsynthese aktivierend wirkt, an der Carbamylphosphatase II (CAPS II) und der Orotatphosphoribosyltransferase (OPRT) (TATIBANA und SHIGESADA, 1972). PLANET und FOX (1976) konnten an menschlichen Erythrozyten zeigen, daß Purine die PP-Ribose-P Konzentration vermindern.

CHEN und JONES (1979) zeigten an Ehrlichs Ascites Tumorzellen, daß Adenin, in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, die Pyrimidinsynthese an zwei Stellen hemmt, wobei die Hemmung des ersten Teils überwog. Da unter ihren Versuchsbedingungen die PP-Ribose-P Konzentration in Gegenwart von Adenin vermindert war, führten sie die Hemmung auf die verminderte intrazelluläre PP-Ribose-P Konzentration zurück.

POTVIN konnte am Rattenhirn zeigen, daß Barbitursäure, in Analogie zu 6-aza-Uridin, 5-aza-Orotsäure und Oxipurinol in Anwesenheit von Mg^{2+} und PRPP, ein starker Hemmstoff der ODC-ase ist. In Übereinstimmung damit sprechen unsere Ergebnisse dafür, daß Natriumphenyläthylbarbitursäure den zweiten Teil der Pyrimidinsynthese hemmt und so zu einer intrazellulären Anhäufung von Orotsäure führt.

Der Einbau von Uridin in Nukleinsäuren wird durch 0,5 mmol/l Guanin und 0,005 - 0,05 mmol/l Adenosin gering erhöht. Wir konnten zeigen, daß dies nicht durch eine Aktivierung der Uridinkinase verursacht

wird (BANHOLZER, unveröffentlichte Daten).

Auch ein Isotopenverdünnungseffekt durch verminderte Produktion von nicht markiertem Uridinmonophosphat durch die de novo Synthese ist unwahrscheinlich, da andere Purine mit gleicher Hemmwirkung nicht zu einem erhöhten Uridineinbau führen.

Ursächlich in Frage kommen könnte eine vermehrte Bildung von ATP aus Adenin und Adenosin, da ATP als Substrat der Uridinkinase, dem limitierenden Enzym des Salvage pathway, zu vermehrter Metabolisierung von Uridin führen kann.

Die Verminderung des Einbaus aller drei Substanzen, Bicarbonat- ^{14}C , Crotsäure-6- ^{14}C , Uridin-2- ^{14}C , durch 0,5 mmol/l Adenosin und 50 mmol/l NAPAB spricht für eine toxische Wirkung dieser Substanzen in hohen Konzentrationen. Die toxische Wirkung hoher Konzentrationen von Adenosin ist bekannt (HENDERSON, 1980).

ISHII und GREEN (1974) fanden toxisch bedingte morphologische Veränderungen in Lymphozytenkulturen nach 8-stündiger Inkubation mit 0,5 mmol/l Adenosin.

Wir fanden nach zweistündiger Inkubation mit Adenosin noch keinen Hinweis auf morphologische Veränderungen im Trypanblautest.

Guanin führt in vivo nicht zu einer Verminderung der Crotazidurie, während in unseren Zellversuchen eine, wenn auch deutlich geringere Hemmung der Pyrimidinsynthese beobachtet wurde. Dies könnte sich sowohl

durch die von uns beobachtete sehr geringe Beeinflussung der Pyrimidinsynthese bei unphysiologisch hohen Konzentrationen erklären als auch durch eine geringe Resorption von Guanin bei Ernährungsversuchen, wegen seiner schlechten Löslichkeit.

Überträgt man unsere Ergebnisse auf den Gesamtorganismus, so spricht die Zunahme des Orotsäurepools in menschlichen Lymphozytenkulturen in Anwesenheit von Hemmstoffen der ODC, Oxipurinol, NaPAB der in vivo beobachteten Orotazidurie.

Ebenso steht die von uns beobachtete Verminderung der Orotsäuresynthese durch Purine in guter Übereinstimmung mit der Abnahme der allopurinol-induzierten Orotazidurie durch Nahrungspurine.

6. ZUSAMMENFASSUNG.

Ernährungsversuche unter standardisierten Ernährungsbedingungen haben gezeigt, daß Nahrungspurine die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie vermindern.

Man konnte an Versuchspersonen, denen eine purin- und pyrimidinfreie Diät verabreicht wurde, zeigen, daß Ribonucleinsäure oder Ribonucleinsäure-Hydrolysat die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie vollständig oder teilweise reduzieren.

In weiteren Untersuchungen zeigte sich, daß auch die orale Verabreichung von Purin- und Pyrimidinnucleosiden, sowie -nucleotiden und Hypoxanthin in unterschiedlichem Maße zu einer Verminderung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie führt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Purine näher zu untersuchen. Darüber hinaus wurde Natriumphenyläthylbarbituricum (NaPAB) untersucht, da verschiedene Experimente in unserem Labor ergeben hatten, daß die Verabreichung von Barbitursäure zu einer Orotazidurie führt.

Mit Hilfe von menschlichen Lymphozytenkulturen wurde ein Modell aufgebaut, das es ermöglichte, die Ernährungsversuche gewissermaßen in vitro nachzuvollziehen und damit die zellulären Mechanismen der Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Purine näher zu betrachten.

Durch Messung des Einbaus von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure konnte man den ersten Teil der Pyrimidinsynthese, durch Messung des Einbaus von Orotsäure-6- ^{14}C in Nucleinsäuren den zweiten Teil der Pyrimidinsynthese beurteilen.

Der Salvage pathway wurde durch den Einbau von Uridin-2- ^{14}C in Nucleinsäuren untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß Na-Barbiturat zu einer Verminderung des Orotsäure-6- ^{14}C Einbaus in Nucleinsäuren führt, während der Einbau von Bicarbonat- ^{14}C in Orotsäure vermehrt ist und so zu einer Vergrößerung des Orotsäurepools führt.

Die untersuchten Purine Adenin, Adenosin, Guanin und Guanosin führten trotz Hemmung des zweiten Teils der Pyrimidinsynthese nicht zu einer Anhäufung von Orotsäure-6- ^{14}C aus Bicarbonat- ^{14}C , sondern zu einer Verminderung von Orotsäure-6- ^{14}C . Dies liegt daran, daß sie gleichzeitig den ersten Teil der Pyrimidinsynthese hemmen. Diese Hemmung des ersten Teils der Pyrimidinsynthese ist jedoch stärker als die Hemmung des zweiten Teils.

Übertragen auf den Gesamtorganismus weisen unsere Ergebnisse darauf hin, daß Purine die Orotsäuresynthese vermindern und dadurch zu einer Verminderung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie führen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

APPEL, S.H.:

Purification and kinetic properties of brain
orotidine 5 phosphate decarboxylase.

J. Biol. Chem., 243, 3924, 1968.

BANHÖLZER, P., GRÖBNER, W., ZÖLLNER, N.:

Der Einfluß von Purinen sowie Oxipurinol auf den
Pyrimidinstoffwechsel in menschlichen Lymphozyten-
kulturen.

Verh. dtsh. Ges. inn. Med., 86, 928, 1980.

BANHÖLZER, P., GRÖBNER, W., ZÖLLNER, N.:

Effect of allopurinol on pyrimidine metabolism in human
white blood cells. Role of the salvage pathway.

Advances In Experimental Medicine And Biology

Volume, 122 B, 209 - 215, 1980. Plenum Press, N.Y.

BANHÖLZER, P., GRÖBNER, W., ZÖLLNER, N.:

Influence of purines on pyrimidine metabolism
in human lymphoblasts in culture.

XII. Int. Congr. of Nutrition, Diego/USA, 1981.

BEARDMORE, T.D., KELLEY, W.N.:

Mechanism of allopurinol-induced inhibition of
Pyrimidine biosynthesis.

J. Lab. clin. Med., 78, 696, 1971.

BELLINGER, J.F., BUIST, N.R.H.:

Rapid column-chromatographic measurement of orotic acid.

Clin. Chem., 17, 1132, 1971.

BOURGET, P.A., NATALE, P.J., TREMBLAY, G.C.:

Pyrimidine biosynthesis in rat liver: studies on the
source of carbamyl phosphate.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 1109, 1971.

BRESNICK, E., HITCHINGS, G.H.:

Feedback control in Ehrlich ascites cells.

Cancer Res.; 21, 105, 1961.

CARDOSO, S.S., CALABRESI, P., HANDSCHUHMACHER, R.E.:

Alterations in human pyrimidine metabolism as a result of therapy with 6-azauridine.

Cancer Res., 21, 1551, 1961.

CASKEY, C.T., ASHTON, D.M., WYNGAARDEN, J.B.:

Enzymology of feedback-inhibition of glutamine-phosphoribosylpyrophosphate-amidotransferase by purine ribonucleotides.

J. biol. Chem., 239, 2570, 1964.

CHEN, J.J., JONES, M.E.:

Effect of 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate on de Novo Pyrimidine Biosynthesis in cultured Ehrlich Ascites cells. Made Permeable with Dextran sulfate 500.

J. Biol. Chem. 254, 2697 - 2704, 1979.

MCCOLLISTER, R.J., GILBERT, W.R., ASHTON, D.M.,

WYNGAARDEN, J.B.:

Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mercaptapurine ribonukleotide and other purine-analogues.

J. Biol. Chem., 239, 1566, 1964.

CORBEEL, L.M., COLOMBO, J.P., VAN SANDE, M.,

WEBER, A.:

Periodic attacks of lethargy in a baby with ammonia intoxication due to a congenital defect in ureogenesis.

Arch. Dis. Child., 44, 681, 1969.

DAVIS, R.H.:

Metabolite distribution in cells. Two carbamylphosphate gradients and their sources can be discerned in *Neurospora*.

Science, 178, 835, 1972.

DELBARRE, F., AMOR, B., AUSCHER, C., DeGERY, A.:

Treatment of gout with allopurinol, a study of 106 cases.

Ann. rheum. Dis., 25, 627, 1964.

FALLON, H.J., FREI, E., III, BLACK, J.,

SEEGMILLER, J.E.:

The uricosuria and orotic aciduria induced by 6-azauridine.

J. Clin. Invest., 40, 1906, 1962.

FOX, R.M., O'SULLIVAN, W.J., FIRKIN, B.G.:

Orotic aciduria Differing enzyme patterns

Am. J. Med., 47, 332, 1969.

FOX, J.H., WYNGAARDEN, J.B., KELLEY, W.N.:

Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate in man, a newly observed effect of allopurinol.

New Engl. J. Med., 283, 1177, 1970 a.

FOX, R.M., ROYSE-SMITH, D., O'SULLIVAN, W.J.:

Orotidinuria induced by allopurinol.

Science, 168, 861, 1970 b.

FOX, R.M., WOOD, M.H., ROYSE-SMITH, D.,

O'SULLIVAN, W.J.:

Hereditary orotic aciduria Types I and II.

Am. J. Med., 55, 791, 1973.

GOLDSTEIN, A.S., HOOGENRAAD, N.J., JOHNSON, J.D.,
FUKANAGA, K., SWIERZEWSKI, E., CANN, H.M.,
SUNSHINE, P.:

Metabolic and genetic studies of a family with ornithine
transcarbamylase deficiency.

Pediatr. Res., 8, 5, 1974.

GRÖBNER, W., ZÖLLNER, N.:

Störungen des menschlichen Pyrimidinstoffwechsels.

Münch. med. Wschr., 117, 1453 - 1455. Nr. 37, 1975.

GRÖBNER, W., ZÖLLNER, N.:

Zur Beeinflussung der Purin- und Pyrimidinsynthese
durch Allopurinol.

Klin. Wschr., 53, 255-, 1975.

GRÖBNER, W., ZÖLLNER, N.:

Der Einfluß von Nahrungspurinen und -pyrimidinen
auf die Pyrimidinsynthese des Menschen.

Klin. Wochenschr., 61, 1191 - 1197, 1983.

GRÖBNER, W., KELLEY, W. N.: Unpublished results:

HANDSCHUHMACHER, R.E.:

Orotidylic acid decarboxylase: Inhibition studies
with azauridine 5'phosphate.

J. Biol. Chem., 235, 2917, 1960.

HENDERSON, J.F., SCOTT:

Inhibition of animal and intervertebrate cell growth
by naturally occurring purine bases and ribonucleotides.

Pharma. Ther. Vol. 8, 539 -571, 1980.

HOLMES, E.W., McDONALD, J.A., McCORD, J.M.,

WYNGAARDEN, J.B., KELLEY, W.N.:

Human glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotrans-
ferase: Kinetic and regulatory properties.

J. Biol. Chem., 248, 144, 1973.

ISHII, K., GREEN, H.:

Lethality of Adenosine for cultured mammalian cells by interference with pyrimidine biosynthesis.

J. Cell. Sci., 13, 429 - 439. 1973.

KANG, E.S., SNODGRASS, P.J., GERALD, P.S.:

Ornithine transcarbamylase deficiency in the new born infant.

J. Pediatr., 82, 642, 1973.

KELLEY, W.N., WYNGAARDEN, J.B.:

Effects of dietary purine restriction, allopurinol and oxipurinol on the urinary excretion of ultraviolet-absorbing compounds.

Clin. Chem., 16, 707, 1970 a.

KELLEY, W.N., BEARDMORE, T.D.:

Allopurinol: alteration in pyrimidine metabolism in man.

Science, 169, 388, 1970.

LACROUTE, F., PIERARD, A., GENSON, M., WIAME, J.M.:

The biosynthesis of carbamylphosphate in *Saccharomyces cerevisiae*.

J. Gen. Microbiol., 40, 127, 1965.

McLEOD, P., MACKENZIE, S., SCRIVER, C.R.:

Partial ornithine carbamyltransferase deficiency: An inborn error of the urea cycle presenting as orotic aciduria in a male infant.

C. M. A. J., 107, 405, 1972.

LEVIN, B., ABRAHAM, J.M., OBERHOLZER, V.G.,

BURGESS, E.A.:

Hyperammonaemia: A deficiency of liver ornithine transcarbamylase: occurrence in mother and child.

Arch. Dis. Child., 44, 152 - 167, 1969.

KELLEY, W.N., SMITH, L.H., JR.:

Disorders of purine and pyrimidine metabolism. In:
The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.),
edited by J.B. STANBURG, J.B. WYNGAARDEN and
FREDERICKSON. New York:
McGraw-Hill Book Co. 1978. p. 1045.

KENNEDY, J.:

Distribution subcellular localization, and product
inhibition of dihydroorotateoxidation in the rat.
Arch. Biochem. Biophys., 157, 369, 1973.

KLINENBERG, J.R., GOLDFINGER, S.E., SEEGMILLER, J.E.:

The effectiveness of the xanthine oxidase inhibitor
allopurinol in the treatment of gout.
Ann. inter. Med., 62, 639, 1965.

LEVINE, R.L., N.J. HOOGENRAAD, N. KRETSCHMER:

Regulation of activity of carbamylphosphat synthetase
from mouse spleen.
Biochemistry 10: 3694, 1971.

LEVINE, R.L., N.J. HOOGENRAAD, N. KRETSCHMER:

A review: Biological and clinical aspects of pyrimidine
metabolism.
Pediatr. Res., 8, 724, 1974.

LUE, P.F., KAPLAN, V. G.:

The aspartate transcarbamylase and carbamoyl phosphate
synthetase of yeast: a multi-functional enzym complex.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 426, 1969.

MILNER, J.A., VISEK, W.J.:

Orotica aciduria and arginin deficiency.
Nature (Lond.), 245, 211, 1973.

MILNER, J.A., VISEK, W.J.:

Urinary metabolites characteristic of urea-cycle
amino acid deficiency.
Metabolism. 24. 643 - 652. 1975.

MORI, M., TATIBANA, M.:

Purification of homogeneous glutamine dependent carbamylphosphate synthetase from ascites hepatoma cells as a complex with aspartate transcarbamylase and dihydroorotase.

J. Biochem. (Tokyo), 78, 239, 1975.

MORI, M., H. ISHIDA, M. TATIBANA:

Aggregation states and catalytic properties of the multienzyme complex catalyzing the initial steps of pyrimidine biosynthesis in rat liver.

Biochemistry 14: 2622, 1975.

NATALE, P.J., TREMBLAY, G.C.:

On the availability of intramitochondrial carbamyl phosphate for the extramitochondrial biosynthesis of pyrimidines.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 512, 1969.

PLANET, G., FOX, H.:

Inhibition of Phosphoribosylpyrophosphate Synthesis by Purine Nucleosides in Human Erythrocytes.

J. Biol. Chem., 251, 5839 - 5844, 1976.

POTVIN, B.W., STERN, H.J., MAY, S.P., LAM, G. F., KROOTH R.S.:

Inhibition by barbituric acid and its derivatives of the enzymes in rat brain which participate in the synthesis of pyrimidine ribotides.

Department of Human Genetics and Development, College of Physicians and Surgeons, Columbia-University, New York, NY 10032, USA. Received 18th March 1977, accepted 6th June 1977.

POTVIN, B.W., STERN, H.J., MAY, S.R., LAM, G.F.,
KROOTH, R.S.:

Inhibition by barbituric acid and its derivatives
of the enzymes in rat brain which participate in
the synthesis of pyrimidine ribotides.

Biochem. Pharmacol., 27, 655 - 665, 1978.

RAIVIO, K.O., HOVI, T.:

Purine reutilization in phytohemagglutininstimulated
human T-lymphocytes.

Exp. Cell. Res., 116, 75 - 85. 1978.

RUNDLES, R.W., SILBERMAN, H.R., HITCHINGS, G.H.,
ELION, G.B.:

Effects of xanthine oxidase inhibitor on clinical
manifestations and purine metabolism in gout.

Anm. intern.Med., 60, 717, 1964.

SHOAF, W.T., JONES, M. E.:

Uridylic acid synthesis in Ehrlich ascites carcinoma.
Properties, subcellular distribution and nature of
enzyme complexes of the six biosynthetic enzymes.

Biochemistry 12: 4039, 1973.

SUNSHINE, P., LINDENBAUM, J.E., LEVY, H.L.,
FREEMAN, J.M.:

Hyperammonaemia due to a defect in hepatic ornithine
transcarbamylase.

Pediatrico, 50, 100, 1972.

STATTER, M., RUSSEL, A., ABZERG-HOROWITZ, S., PUISON, A.:

Abnormal orotic metabolism associated with acute
hyperammonaemia in the rat.

Biochem. Med., 9, 1 - 24, 1974.

SEEGMILLER, J.E.:

Hereditary orotic aciduria in Duncan's Disease of Metabolism,

edited by P.K. Bondy, p. 570.

Saunders, Philadelphia, 1969.

TATIBANA, M., SHIGESADA:

Control of pyrimidine biosynthesis in mammalian tissues.

V. Regulation of glutamine-dependent carbamylphosphate synthetase: Activation by 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate and inhibition by uridine triphosphate.

J. Biochem. (Tokyo), 72, 549, 1972.

THALER, M.M., HOOGENRAAD, N.J., BOSWELL, M.:

Reye's syndrome due to a novel protein variant of ornithine transcarbamylase deficiency.

Lancet, 2, 438, 1974.

THALER, M.M.:

Role of ornithinetranscarbamylase in Reye's syndrom.

N. Engl. J. Med., 291, 797, 1974 (letter).

WYNGAARDEN, J.B., RUNDLES, R.W., SILBERMAN, H. R.,

HUNTER, S.:

Control of hyperuricemia with hydroxypyrazolonpyrimidine, a purine analogue, which inhibits uric acid synthesis.

Arthr. and Rheum., 6, 306, 1963.

WYNGAARDEN, J.B., RUNDLES, R.W., METZ, E.N.:

Allopurinol in the treatment of gout.

Ann. intern. Med., 62, 842, 1965.

YÜ, T.F., GUTMAN, A.B.:

Effect of allopurinol (4-hydroxypyrazolon(3,5 d)-pyrimidine) on serum and urinary uric acid in primary and secondary gout.

Amer. J. Med., 37, 885, 1964.

ZÖLLNER, N.:

Die Behandlung der Gicht und der Uratnephrolithiasis mit Allopurinol.

Verb. deutsch. Ges. in. Med., 72, 781, 1966.

ZÖLLNER, N., SCHATTENKIRCHNER, M.:

Allopurinol in der Behandlung der Gicht und der Harnsäurenephrolithiasis.

Dtsch. med. Wschr., 92, 654, 1967.

ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W.:

Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote.

Europ. J. clin. Pharmacol., 3, 56, 1970.

ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W.:

Influence of oral ribonucleic acid on orotaciduria due to allopurinol administration.

Z. Ges. exp. Med., 156, 317, 1971.

ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W.:

Dietary feedback regulation of purine and pyrimidine biosynthesis in man.

CIBA Found. Symp., 48, 165, 1977.

ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W., RAUCH-JANSEN, A.:

The effect of different purines and pyrimidines on human biosynthesis.

Adv. Exptl. Med. Biol., 76B, 269, 1977.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP	= Adenosin-5-monophosphat
ATC	= Aspartat-Transcarbamylase
ATP	= Adenosintriphosphat
CDP	= Cytidin-5-diphosphat
CMP	= Cytidin-5-monophosphat
CPS	= Karbamylphosphat-Synthetase
CTP	= Cytidin-5-triphosphat
DHO	= Dihydroorotase
DHOD	= Dihydroorotsäure-Dehydrogenase
HGPRT	= Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
NaPAB	= Natriumphenyläethylbarbituricum
ODC	= Orotidin-5-Phosphatdekarboxylase
OPRT	= Orotatphosphoribosyl-Transferase
OTC	= Ornithin-Transcarbamylase
PRPP	= Phosphoribosylpyrophosphat
RNS	= Ribonucleinsäure
UDP	= Uridin-5-diphosphat
UMP	= Uridin-5-monophosphat
UTP	= Uridin-5-triphosphat

8. LEBENSLAUF

Ich, Adelheid Laurien, wurde am 16. November 1949 als Tochter des Hans-Joachim Laurien und dessen Ehefrau Erika Laurien, geb. Blöchl, in Moosburg a.d. Isar geboren.

Ab 1954 besuchte ich die Grundschule in München und wechselte dann auf das Angergymnasium über. 1970 bestand ich dort das Abitur. An der Ludwig-Maximilians-Universität belegte ich die Fächer Chemie und Biologie, bis ich die Zulassung zur Zahnheilkunde erhielt.

Am 1. April 1982 bestand ich die zahnärztliche Prüfung. Seit 1. November 1982 arbeite ich als Ausbildungsassistentin in der freien Praxis.

